บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

เมื่อเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอทั้ง 2 วิธี คือ การสกัดด้วยชุด Kit และ การสกัดด้วยวิธีการดัดแปลงจากวิธีของ Doyle & Doyle พบว่าทั้งคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอที่ได้นั้นไม่มีความแตกต่างกัน ทั้ง 2 วิธี ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความคมชัด และ มีคุณภาพดี ทั้ง 2 วิธีมีขั้นตอนคล้ายกัน คือ การบดตัวอย่าง การสกัดโปรตีนและอาร์เอ็นเอ และ การตกตะกอนดีเอ็นเอ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้วิธีการดัดแปลงจากวิธีของ Doyle & Doyle (อุไรวรรณ, 2540) เนื่องจากประหยัดกว่าการใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป และ สารเคมีที่นำมาสกัดสามารถเตรียมเองได้ในห้องปฏิบัติการ

การตัดดีเอ็นเอ ในเทคนิค AFLP นิยมใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดในการตัด คือ ชนิดที่มีตำแหน่งจดจำ 4 ตำแหน่ง (frequent cutter) และ ชนิดที่มีตำแหน่งจดจำ 6 ตำแหน่ง (rare cutter) เนื่องจากการตัดด้วยเอ็นไซม์ 2 ชนิดให้ชิ้นดีเอ็นเอมากกว่าชนิดเดียว (Vos *et al.*, 1995) ในการทดลองนี้ใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Mse*I หลังจากนั้นนำไปบ่มไว้ที่ 2 ชั่วโมง หรือ ข้ามคืน พบว่าผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกัน คือ แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นปื้นสม่ำเสมอแสดงว่าการตัดเกิดขึ้นอย่างสุ่มทั้งจีโนม ดีเอ็นเอที่ได้มีทั้งโมเลกุลเล็ก และ โมเลกุลใหญ่ และ ไม่มีดีเอ็นเอโมเลกุลใหญ่ที่เป็น uncut เหลืออยู่ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้ระยะเวลาในการบ่ม 2 ชั่วโมง เนื่องจากใช้เวลาสั้นกว่า นอกจากนี้ได้ทำการทดสอบปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นในการทำการตัดดีเอ็นเอ คือ ปริมาณ 250, 500 หรือ 750 นาโนกรัม พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันในทุกปริมาณ จึงเลือกใช้ปริมาณดีเอ็นเริ่มต้นที่ 250 นาโนกรัม เนื่องจากใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นน้อย

ดีเอ็นเอ adapter ที่ใช้ในการต่อกับดีเอ็นเอ หลังการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะเป็นดีเอ็นเอซึ่งมีความจำเพาะเจาะจง โดยปลายของ adapter เป็นเบสคู่สมกับเบสในตำแหน่ง restriction site ของเอ็นไซม์ *Eco*RI และ *Mse*I adapter จึงถูกนำมาต่อกับชิ้นดีเอ็นเอ เพื่อเป็นตำแหน่งให้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงเข้ามาจับ (Vos *et al.*, 1995) ในการทดลองนี้หลังจากต่อดีเอ็นเอเข้ากับ adapter เป็นเวลา 2, 4, 6 หรือ 12 ชั่วโมง จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้ไปทำปฏิกิริยา PCR พบว่าผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกัน คือ adapter ต่อกับปลายดีเอ็นเอต้นแบบเป็นจุดเริ่มต้นให้สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ และ มีจำนวนและขนาดของแถบเหมือนกัน ดังนั้น จึงเลือกระยะเวลาในการบ่ม 2 ชั่วโมง

การเจือจางดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา PCR ในการทดลองนี้หลังจากที่ต่อ adapter เข้าที่ปลายชิ้นส่วนดีเอ็นเอแล้ว และ เจือจางดีเอ็นเอที่อัตรา 1:5, 1:10 หรือ 1:50 เพื่อทำปฏิกิริยา PCR พบว่า แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นไม่มีความแตกต่างกัน จึงเลือกใช้การเจือจางดีเอ็นเอที่ 1:50 เนื่องจากใช้ดีเอ็นเอน้อย และ เป็นอัตราที่แนะนำใน Instruction Manual ของบริษัท Invitrogen life technologies.

การคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการทำ selective amplification ได้ทำการทดสอบไพรเมอร์ 64 คู่ พบว่ามีไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของบัวชั้นได้จำนวน 46 คู่ ในการทดสอบนี้ใช้อกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เพื่อความสะดวก และ รวดเร็วในการเตรียมการ เนื่องจากไพรเมอร์ที่นำมาทดสอบมีจำนวนมาก และ มีจุดประสงค์เพื่อคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของบัวชั้นได้เท่านั้น โดยยังไม่ต้องการความละเอียดในการแยกแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น ไพรเมอร์ที่เลือกใช้เป็นคู่ที่สามารถให้ลักษณะแถบดีเอ็นเอที่มีความคมชัด และ มีจำนวนแถบมาก คัดเลือก 5 ไพรเมอร์ ดังนี้ E-AAC + M-CAC, E-ACC + M-CTC, E-AGC + M-CAG, E-AGC + M-CAT และ E-AAC + M-CAT

การคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ในการทำ PCR เป็นขั้นตอนที่สำคัญ และ จำเป็นสำหรับเทคนิค AFLP เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ไม่ต้องมีข้อมูลพื้นฐานของพืช การใช้ไพรเมอร์ที่ลำดับเบสต่างกันไปจึงเป็นการสุ่มเพื่อเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอต้นแบบจากพืชที่ทำการศึกษา ยุคลธร (2542) ทดสอบไพรเมอร์จำนวน 64 คู่ พบว่ามีคู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมังคุดหลังสวน 2 และ ชะมวง ได้จำนวน 40 คู่ นอกจากนี้ Zhang (2001) ทดสอบไพรเมอร์จำนวน 11 คู่ พบว่าไพรเมอร์ที่สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่เป็น polymorphic ในกุหลาบ โดยพบว่าคู่ไพรเมอร์ E-AAC + M-CAC ให้แถบดีเอ็นเอที่เป็น polymorphic 37 แถบ และ คู่ไพรเมอร์ E-ACC + M-CTC ให้แถบดีเอ็นเอที่เป็น polymorphic 36 แถบ

เมื่อนำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มาแยกขนาดโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส บนโพลีอะคริลาไมด์เจลเพื่อการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในตัวอย่างบัวชั้น พบว่า แต่ละคู่ไพรเมอร์ ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมาก แต่เป็นแถบที่มีขนาดเท่ากัน (monomorphic band) เป็นส่วนใหญ่ จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์แต่ละคู่ มีดังนี้

กลุ่มลักษณะสีกลีบใบประดับชุดที่ 1 เมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ E-ACC และ M-CTC ให้จำนวนแถบ ดีเอ็นเอ 318 แถบ

กลุ่มลักษณะสีกลีบใบประดับชุดที่ 2 เมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ E-AAC และ M-CAC ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอ 280 แถบ

กลุ่มลักษณะสีก้านช่อดอกชุดที่ 1 เมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ E-AAC และ M-CAT ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอ 20 แถบ และ เมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ E-AGC และ M-CAT ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอ 44 แถบ

กลุ่มลักษณะสีก้านช่อดอกชุดที่ 2 เมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ E-AGC และ M-CAG ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอ 165 แถบ

กลุ่มลักษณะกลีบใบประดับส่วนบน ชุดที่ 1 เมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ E-AGC และ M-CAT ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอ 114 แถบ

กลุ่มลักษณะกลีบใบประดับส่วนบน ชุดที่ 2 เมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ E-AGC และ M-CAG ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอ 185 แถบ

เทคนิค AFLP ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่สูงมาก (Morgante, 1994) เนื่องจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับเบสใน adapter จำนวนแถบที่ได้จึงขึ้นอยู่กับตำแหน่งตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ และ ขนาดของดีเอ็นเอหลังการตัด หากในจีโนมพืชมีตำแหน่งตัดหลายตำแหน่ง และ ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา PCR เมื่อเลือกใช้ไพรเมอร์ที่เหมาะสม ทำให้ได้แถบดีเอ็นเอจำนวนมาก Yee (1999) ได้ศึกษาเปรียบเทียบเทคนิค RAPD และ AFLP ในการตรวจสอบความหลากหลายของ *Vigna angularis* (Azuki) พบว่า ด้วยไพรเมอร์ 1 คู่ มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี RAPD 57 แถบ และวิธี AFLP 214 แถบ เห็นได้ว่าเทคนิค AFLP มีประสิทธิภาพสูงกว่าเทคนิค RAPD ในการเพิ่มแถบดีเอ็นเอ

ความแตกต่างของรูปแบบแถบดีเอ็นเอจากบัวชั้นที่นำมาศึกษา แสดงถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมที่อาจเกิดจาก 1) เบสที่ตำแหน่งจดจำของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะเปลี่ยนไป ตำแหน่งการตัดจึงหายไป หรือ เบสเปลี่ยนไปทำให้เกิดตำแหน่งตัดของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะเพิ่มขึ้น 2) มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น/ขาดหายไป 3) มีการจัดเรียงตัวของโมเลกุลดีเอ็นเอใหม่ในช่วงระหว่างตำแหน่งตัดจำเพาะเดิม ทำให้ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไป นอกจากนี้ยังอาจเกิดจาก 4) การเติมหมู่เมธิลที่แตกต่างกัน (Lee *et al.*, 1997; Folkertsma *et al.*, 1996)

เมื่อพิจารณาการปรากฏและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอแล้วนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างบัวชั้นแต่ละตัวอย่างด้วยวิธี cluster analysis โดยวิเคราะห์แต่ละคู่ไพรเมอร์ และ แต่ละลักษณะของตัวอย่างทำให้สามารถจำแนกบัวชั้นได้ดังนี้

กลุ่มที่จัดตามลักษณะสีกลีบใบประดับ ชุดที่ 1 ทำปฏิกิริยากับไพรเมอร์ E-ACC และ M-CTC สามารถจำแนกบัวชั้นเป็น 7 กลุ่ม (ภาพ 30)

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น G13 และ G2

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น F6

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น F4 และ F7
กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น F2
กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น D3 และ F1
กลุ่มที่ 6 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น E2
กลุ่มที่ 7 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น F14

เมื่อพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของบัวชั้น 7 ลักษณะ ประกอบกับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยวิธี cluster analysis พบว่า กลุ่มที่ 1 มีลักษณะใกล้เคียงกัน 4 ลักษณะ คือ ระยะกลีบใบประดับถี่ ก้านช่อดอกสีเขียว ความยาวช่อดอกปานกลาง และ กลีบดอกเป็นสีขาวนวล กลุ่มที่ 2, 4, 6 ไม่มีลักษณะแตกต่างที่ชัดเจนจากกลุ่มอื่น แต่มีลักษณะต่างกันภายในกลุ่มคือ กลุ่มที่ 2 กลีบดอกเป็นขาวนวลและฉาบแดง กลุ่มที่ 4 มีลักษณะต่างจากกลุ่มที่ 2 คือ ลักษณะกลีบใบประดับป้าน และ ความยาวช่อดอกยาว กลุ่มที่ 6 มีลักษณะต่างจากกลุ่มที่ 2 คือ กลีบใบประดับสีอ่อน ความยาวช่อดอกยาว และ กลีบดอกเป็นสีขาวนวล กลุ่มที่3 มีลักษณะใกล้เคียงกัน 6 ลักษณะ คือ กลีบใบประดับสีอ่อน ระยะกลีบใบประดับห่าง ลักษณะกลีบใบประดับห่อ ก้านช่อดอกสีเขียว ความยาวช่อดอกยาว และ กลีบดอกเป็นสีขาวนวล กลุ่มที่ 5 มีลักษณะใกล้เคียงกัน 3 ลักษณะ คือ ลักษณะกลีบใบประดับป้าน ก้านช่อดอกสีเขียว และ กลีบดอกเป็นสีขาวนวล กลุ่มที่ 7 มีลักษณะต่างจากกลุ่มอื่น คือ กลีบดอกเป็นสีขาวนวล และ ฉาบชมพู

กลุ่มที่จัดตามลักษณะสีกลีบใบประดับ ชุดที่ 2 ทำปฏิกิริยากับไพรเมอร์ E-AAC และ M-CAC สามารถจำแนกบัวชั้นเป็น 7 กลุ่ม (ภาพ 31)

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น A14, E4 และ C11
กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น C8
กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น B9
กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น A15 และ C9
กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น A6
กลุ่มที่ 6 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น E9
กลุ่มที่ 7 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น D1

เมื่อพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของบัวชั้น 7 ลักษณะ ประกอบกับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยวิธี cluster analysis พบว่า มีระยะกลีบใบประดับถี่ในทุกกลุ่ม กลุ่มที่ 1 ย่อย คือ ต้น A14 และ E4 มีลักษณะร่วมอื่น คือ กลีบใบประดับสีเข้ม ต้น E4 และ C11 มีลักษณะร่วมอื่น คือ กลีบใบประดับส่วนบนปลายกลีบกว้าง ก้านช่อดอกสีเขียว และ กลีบดอกเป็นสีขาวนวล

ต้น A14 และ C11 มีลักษณะร่วมอื่น คือ ลักษณะกลีบใบประดับห่อ และ ความยาวช่อดอกปานกลาง กลุ่มที่ 2, 3, 5 และ 6 ไม่มีลักษณะแตกต่างที่ชัดเจนจากกลุ่มอื่น แต่มีลักษณะต่างกันภายในกลุ่มคือ กลุ่มที่ 2 มีลักษณะแตกต่างจากกลุ่ม 3 และ 6 คือ มีความยาวช่อดอกยาว และ แตกต่างจากกลุ่มที่ 5 คือ สีกลีบใบประดับเข้ม ลักษณะกลีบใบประดับห่อ และ กลีบดอกเป็นสีขาวนวล กลุ่มที่ 3 มีลักษณะแตกต่างจากกลุ่ม 2 และ 5 คือ มีความยาวช่อดอกปานกลาง และ แตกต่างจากกลุ่ม 5 คือ สีกลีบใบประดับเข้ม ลักษณะใบประดับห่อ และ กลีบดอกเป็นสีขาวนวล กลุ่มที่ 5 มีลักษณะแตกต่างจากกลุ่ม 2, 3 และ 6 คือ สีกลีบใบประดับอ่อน และ กลีบดอกเป็นสีขาวนวล และ ฉาบแดง แตกต่างจากกลุ่ม 2 และ 3 คือ ลักษณะใบประดับป้าน แตกต่างจากกลุ่ม 3 และ 6 คือ ความยาวช่อดอกยาว กลุ่มที่ 6 มีลักษณะแตกต่างจากกลุ่ม 2 และ 5 คือ ความยาวช่อดอกปานกลาง แตกต่างจากกลุ่ม 2 และ 3 ลักษณะกลีบใบประดับป้าน แตกต่างจากกลุ่ม 5 คือ กลีบใบประดับสีเข้ม และ กลีบดอกเป็นสีขาวนวล กลุ่มที่ 4 มีลักษณะใกล้เคียงกัน 6 ลักษณะ คือ กลีบใบประดับสีอ่อน ลักษณะกลีบใบประดับห่อ ก้านช่อดอกสีเขียว ความยาวช่อดอกยาว และ กลีบดอกเป็นสีขาวนวล กลุ่มที่ 7 มีลักษณะต่างจากกลุ่มอื่น คือ กลีบดอกเป็นสีขาวนวล และ ฉาบชมพู

กลุ่มที่จัดตามลักษณะสีก้านช่อดอก ชุดที่ 1 ทำปฏิกิริยากับไพรเมอร์ E-AAC และ M-CAT ไม่สามารถจำแนกบัวชั้นออกเป็นกลุ่ม (ภาพ 32) อาจเนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ไม่เหมาะสมในการจำแนกลักษณะของบัวชั้น แต่เมื่อนำมาทำปฏิกิริยากับไพรเมอร์ E-ACG และ M-CAT สามารถจำแนกบัวชั้น เป็น 3 กลุ่ม (ภาพ 33)

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น A14, C2, F1, C5, G10 และ F14

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น G9, B5 และ G4

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น A13

เมื่อพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของบัวชั้น 7 ลักษณะ ประกอบกับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยวิธี cluster analysis พบว่า กลุ่มที่ 1 มีลักษณะใกล้เคียงกัน 1 ลักษณะ คือ ระยะกลีบใบประดับถี่ กลุ่มที่ 2 มีลักษณะใกล้เคียงกัน 2 ลักษณะ คือ กลีบใบประดับสีเข้ม และ ระยะกลีบใบประดับถี่ กลุ่มที่ 2 ย่อย คือ ต้น G9 และ B5 มีลักษณะร่วมอื่น คือ กลีบใบประดับสีเข้ม กลีบใบประดับส่วนบนปลายกลีบแหลม และ ลักษณะกลีบใบประดับป้าน กลุ่มที่ 3 มีลักษณะต่างจากกลุ่มอื่น คือ ระยะกลีบใบประดับห่าง

กลุ่มที่จัดตามจากลักษณะสีก้านช่อดอก ชุดที่ 2 ทำปฏิกิริยากับไพรเมอร์ E-AGC และ M-CAG สามารถจำแนกบัวชั้นเป็น 4 กลุ่ม (ภาพ 34)

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น B14, F6 และ A7

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น C14 และ F2

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น A8, E9 และ B8

กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น E12 และ A12

เมื่อพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของบัวชั้น 7 ลักษณะ ประกอบกับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยวิธี cluster analysis พบว่า กลุ่มที่ 1 มีลักษณะใกล้เคียงกัน 4 ลักษณะ คือ กลีบใบประดับสีเข้ม กลีบใบประดับส่วนบนปลายกลีบแหลม ระยะกลีบใบประดับถี่ และลักษณะกลีบใบประดับห่อ กลุ่มที่ 2 มีลักษณะใกล้เคียงกัน 4 ลักษณะ คือ กลีบใบประดับสีเข้ม ระยะกลีบใบประดับถี่ ลักษณะกลีบใบประดับป้าน และ ก้านช่อดอกสีเขียว กลุ่มที่ 3 มีลักษณะใกล้เคียงกัน 2 ลักษณะ คือ กลีบใบประดับส่วนบนปลายกลีบแหลม และ กลีบดอกเป็นสีขาวนวล กลุ่มที่ 3 ย่อย คือ ต้น A8 และ E9 มีลักษณะร่วมอื่น คือ กลีบใบประดับสีเข้ม และระยะกลีบใบประดับถี่ กลุ่มที่ 4 มีลักษณะใกล้เคียงกัน 4 ลักษณะ คือ กลีบใบประดับสีเข้ม กลีบใบประดับส่วนบนปลายกลีบแหลม ระยะกลีบใบประดับถี่ และ กลีบดอกเป็นสีขาวนวล

กลุ่มที่จัดตามลักษณะกลีบใบประดับส่วนบน ชุดที่ 1 ทำปฏิกิริยากับไพรเมอร์ E-ACG และ M-CAT สามารถจำแนกบัวชั้นเป็น 3 กลุ่ม (ภาพ 35)

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น B9, F7, D3, F14, G10 และ E4

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น G4, C8 และ F4

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น A8

เมื่อพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของบัวชั้น 7 ลักษณะ ประกอบกับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยวิธี cluster analysis พบว่า กลุ่มที่ 1 มีลักษณะใกล้เคียงกัน 1 ลักษณะ คือ ก้านช่อดอกสีเขียว กลุ่มที่ 2 มีลักษณะใกล้เคียงกัน 3 ลักษณะ คือ กลีบใบประดับห่อ ก้านช่อดอกสีเขียว และ กลีบดอกเป็นสีขาวนวล กลุ่มที่ 2 ย่อย คือ G4 และ C8 มีลักษณะร่วมอื่น คือ กลีบใบประดับสีเข้ม และ ระยะกลีบใบประดับถี่ กลุ่มที่ 3 มีลักษณะ แตกต่างจากกลุ่มอื่น คือ ก้านช่อดอกสีขาว

กลุ่มที่จัดตามลักษณะกลีบใบประดับส่วนบน ชุดที่ 2 ทำปฏิกิริยากับไพรเมอร์คู่ E-AGC และ M-CAG สามารถจำแนกบัวชั้นเป็น 4 กลุ่ม (ภาพ 36)

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น F6, G2 และ A7

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น A15 และ C14

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น B8, C2 และ F2

กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น C5 และ F1

เมื่อพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของบัวชั้น 7 ลักษณะ ประกอบกับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยวิธี cluster analysis พบว่า กลุ่มที่ 1 มีลักษณะใกล้เคียงกัน 2 ลักษณะ คือ กลีบใบประดับสีเข้ม และ ระยะกลีบใบประดับถี่ กลุ่มที่ 1 ย่อย คือ ต้น F6 และ G2 มีลักษณะร่วมอื่น คือ ก้านช่อดอกสีเขียว กลุ่มที่ 2 มีลักษณะใกล้เคียงกัน 4 ลักษณะ คือ กลีบใบประดับส่วนบนปลายกลีบกว้าง ระยะกลีบใบประดับถี่ ก้านช่อดอกสีเขียว และ กลีบดอกเป็นสีขาวนวล กลุ่มที่ 3 ไม่มีลักษณะแตกต่างจากกลุ่มอื่นอย่างชัดเจน แต่กลุ่ม 3 ย่อย คือ B8 และ C2 มีลักษณะใกล้เคียงกัน คือ กลีบใบประดับสีอ่อน ลักษณะกลีบใบประดับห่อ ก้านช่อดอกสีขาว และ กลีบดอกเป็นสีขาวนวล กลุ่มที่ 4 มีลักษณะใกล้เคียงกัน 2 ลักษณะ คือ ระยะกลีบใบประดับถี่ และ กลีบดอกเป็นสีขาวนวล

ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกจัดกลุ่มเพื่อศึกษาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา 3 ลักษณะ แต่เมื่อพิจารณาร่วมกันระหว่างไพรเมอร์และลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้ง 3 แล้วนั้นไม่สามารถจำแนกบัวชั้นออกได้ตามลักษณะที่กำหนด ทั้งนี้ อาจเป็นเพราะ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เลือกนั้นมียีนที่ควบคุมลักษณะนั้นๆ หลายตัวด้วยกัน (สุรินทร์, 2536) หรือไพรเมอร์ที่เลือกใช้ไม่มีความสัมพันธ์กับตำแหน่งยีนที่ควบคุมลักษณะดังกล่าว แม้ว่าเทคนิค AFLP ให้แถบเครื่องหมายจำนวนมาก แต่ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า มีแถบที่เป็น monomorphic จำนวนมากเช่นกัน ซึ่งอาจเนื่องมาจากการมีพื้นฐานพันธุกรรมใกล้เคียงกันของบัวชั้น หรือไพรเมอร์ที่เลือกใช้ยังไม่เหมาะสม จึงจำเป็นต้องนำลักษณะทางสัณฐานวิทยาอีก 4 ลักษณะมาวิเคราะห์ร่วมกันซึ่งพบว่า กลุ่มที่ถูกแบ่งด้วย cluster analysis มีลักษณะที่คล้ายกันภายในกลุ่ม หรือ มีลักษณะเฉพาะที่ต่างจากกลุ่มอื่นๆ ซึ่งหากศึกษาเพิ่มเติมอาจนำไปสู่การใช้เครื่องหมายทางโมเลกุล เพื่อช่วยในการคัดเลือกลักษณะฟีโนไทป์ บัวชั้นบางต้นที่ไม่สามารถจัดเข้ากลุ่มได้ แม้จะมีลักษณะหลายอย่างที่คล้ายกลุ่มอื่นๆ แสดงให้เห็นถึงพันธุกรรมที่แตกต่าง โดยมีฟีโนไทป์ใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามผลจากการศึกษาครั้งนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อการศึกษาในด้านยีนที่ควบคุมลักษณะของบัวชั้นในอนาคต ซึ่งมีประโยชน์อย่างมากในการปรับปรุงพันธุ์หรือพัฒนาพันธุ์ต่อไป